

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/002170

International filing date: 06 July 2005 (06.07.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0052652
Filing date: 07 July 2004 (07.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 July 2005 (22.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

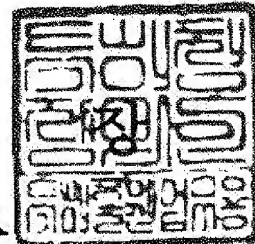
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0052652 호
Application Number 10-2004-0052652

출 원 일 자 : 2004년 07월 07일
Date of Application JUL 07, 2004

출 원 인 : 공주대학교 산학협력단 외 1 명
Applicant(s) KONGJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY
ACADEMIA COOPERATION GROUP,
et al

2005 년 07 월 19 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2004.07.07
【발명의 국문명칭】	염색체 17 p 11.2-p 12 지역의 중복 및 결실로 발병하는 유전성 신경질환의 진단방법 및 진단키트
【발명의 영문명칭】	Diagnosis method and kits for inherited neuropathies caused by duplication or deletion of chromosome 17p11.2-p12 region
【출원인】	
【성명】	정기화
【출원인코드】	4-1999-039873-8
【출원인】	
【성명】	최병옥
【출원인코드】	4-2002-013758-0
【대리인】	
【성명】	유병선
【대리인코드】	9-1999-000235-9
【포괄위임등록번호】	2004-047267-6
【포괄위임등록번호】	2004-047299-5
【발명자】	
【성명】	정기화
【출원인코드】	4-1999-039873-8
【발명자】	
【성명】	최병옥

【출원인코드】 4-2002-013758-0

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 12

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
유병선 (인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 38,000 원

【가산출원료】 25 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 5 항 269,000 원

【합계】 307,000 원

【감면사유】 개인(70%감면)

【감면후 수수료】 92,100 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 17번 염색체 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실로 발병하는 CMT1A 및 HNPP 유전병을 진단하는 방법 및 진단키트에 관한 것이다. 본 발명에서는, 17p11.2-p12 지역의 microsatellite를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA 타이핑하여 해당 지역의 중복 및 결실을 판단하는 유전성 신경질환의 진단방법에 있어서, D17S921, D17S9B, D17S9A, D17S918, D17S122 및 D17S4A의 6좌위를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 중복 및 결실을 판단하는 것을 특징으로 하는 유전성 신경질환의 진단방법이 제공된다. 본 발명에 따르면, 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 검출하는 진단의 정확도가 99.9% 이상이 된다.

【대표도】

도 3

【색인어】

유전성 신경질환, 17번 염색체, 17p11.2-p12, 중복, 결실, CMT1A, HNPP, 진단 키트

【명세서】

【발명의 명칭】

염색체 17 p 11.2- p 12 지역의 중복 및 결실로 발병하는 유전성 신경질환의 진단방법 및 진단키트 {Diagnosis method and kits for inherited neuropathies caused by duplication or deletion of chromosome 17p11.2-p12 region}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 17번 염색체 17p11.2-p12의 1.5Mb 범위에 분포하는 microsatellite의 특성을 나타낸 것이다.
- <2> 도 2a 내지 2c는 본 발명의 진단키트를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 자동염기서열분석기를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 본 발명의 진단키트를 이용하여 환자 가계를 분석한 가계도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <4> 본 발명은 17번 염색체 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실로 발병하는 CMT1A 및 HNPP 유전병을 진단하는 방법 및 진단키트에 관한 것이다.
- <5> 유전성 신경질환 (Inherited neuropathy: IN)은 가족력을 가지며 유전자의

돌연변이에 의해 운동 및 감각 신경 계통의 기능 이상을 나타내는 선천성

질환이다. 유전성 신경질환에는 샤르코-마리-투스병 (Charcot-Marie-Tooth disease, CMT), HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies), DS S(Dejerine-Sottas syndrome) 및 CH (congenital hypomyelination neuropathy) 등이 포함된다. 이들은 유전적으로 이질적인 요인들에 의해 발병되며, 유전성 신경질환 중 가장 높은 출현 빈도를 보이는 CMT는 유럽인에서 대략 1:2,500의 발병율을 보이며, HNPP는 10만명 당 16명의 출현 빈도를 보인다.

<6>

CMT 질환은 주로 하지 비골 근육에서 서서히 진행되는 근력 약화와 위축을 특징으로 하며, 무반사증(areflexia), 말단 감각 소실(distal sensory loss), 발모양의 기형화(pes cavus)를 나타내는데, 청력장애(deafness)를 나타내기도 한다. 발병은 10대 전후에 주로 일어나지만 드물게 30대 이후에도 일어난다. 그러나, CMT 질환의 임상적 표현형과 발병 연령은 매우 이질적이며 확진을 위한 신경조직 검사(nerve biopsy)도 용이하지 않으므로 정확한 진단과 치료를 어렵게 한다 (Berger P., Young P., Suter U. Neurogenet. 4: 1-15 (2002)).

<7>

HNPP 질환은 상염색체 우성 유전질환으로 반복적인 신경통 및 근력 약화를 보이고 신경 생검상 수초가 부분적으로 비대된 tomacula를 보이는 신경계 질환으로서 환자들의 70%-100%에서 염색체 17p11.2-p12의 유전자 결손이 관찰된다. HNPP 질환은 서구에 비해 우리나라에서는 보고된 예가 적은데 그 이유는 확진을 위해서는 신경 조직 갈래 검사(nerve fiber teasing)로 tomacula를 확인해야 한다는 기술적인 문제 때문인 것으로 생각된다. 그러나 최근에는 유전자 검사를 통하여 이 질

환을 쉽게 진단할 수 있기 때문에 빈도는 더욱 늘어날 것으로 생각된다.

<8> 최근 인간의 유전체 연구와 바이오정보학의 발달로 유전병의 원인 유전자를 분리하고 분자생물학적 기전을 밝히는 연구가 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있다. 환경적 요인보다는 유전적 요인에 의해 발병하는 것으로 알려진 CMT 질환에 대한 유전적 원인 분석도 상당히 수행되었는데, 지금까지 10여개의 유전자가 CMT 질환의 발병과 연관된 것으로 알려졌으며, 17p11.2-p12 1.5Mb의 중복/결실을 제외하고는 대부분의 돌연변이가 SNP 및 짧은 염기서열의 중복/결실에 의한 것으로 밝혀졌다. 표 1은 지금까지 알려진 중요한 CMT 질환을 유발하는 유전자들의 유전방식 및 표현형을 나타낸 것이다.

【표 1】

유전자	Loci	Inheritance mode	임상적 표현형 (Clinical phenotype)	No. of mutation found
PMP22	17p.11.2	Autosomal dominant	CMT1, HNPP, DSS, Deafness	59
Cx32X	Xq13.1	X-linked dominant	CMT1X	265
MPZ	1q22	Autosomal dominant Autosomal recessive	CMT1B, CMT2, DSS, Deafness	99
EGR2	10p21.1-p22.1	Autosomal dominant	CMT1(severe), DSS, CII	10
NEFL	8p21	Autosomal dominant Autosomal recessive	CMT1F, CMT2E	24
PRX	10p13.1-p13.2	Autosomal recessive	CMT1, CMT4F, DSS	17

<10> 각 CMT 질환 환자는 단일 유전자 결함(single gene mutation)에 의해 발병하며, 증상의 정도는 차이가 있지만 발병여부는 멘델의 법칙에 매우 충실하다. 현재

유전자 검사가 시행되는 대부분의 질병들은 다유전적 요인(polygenic inheritance)과 환경적 요인의 복잡한 상호작용에 의해 발병하는 질병들이므로, 이들에 대한 유전자 검사는 단지 발병에 대한 경향성을 제시하는데 그친다 (예: 고호모시스테인 혈증과 연관된 MTHFR, 유방암을 일으키는 BRC-A BRC-B 유전자검사). 그러나 CMT 질환은 페닐케톤뇨증(PKU)의 경우처럼 유전적 결함과 발병이 거의 직접적으로 연관되어 유전자검사 결과는 단순한 경향성이나 발병의 가능성 제시의 차원이 아닌 확진의 의미를 가지므로, 유전자진단 키트를 활용하기에 매우 적합한 유전병이다.

<11> 따라서, 유전성이 강하면서도 단일 유전자 결함에 의해 발병하는 유전성 신경질환에 대해 유전자 검사를 통한 병인을 규명한다면 보다 정확한 진단과 근본적인 치료가 가능할 것이다. 또, 지금까지는 유전성 신경질환에 대해 조기진단을 한다 해도 적절한 치료방법이 없어 조기진단의 필요성이 대두되지 않았으나 최근 CMT1A에 대한 치료제로서 아스코르빈산(Ascorbic acid)과 프로게스테론 길항제 (Progesterone antagonist)가 효과가 있음이 논문을 통해 발표된 바 있다 (Sereda M.W., Horste G.M., Suter U., Uzma N., Nave K.-A. Nature Genet. 9: 1533-1537 (2003); Passage E., Norreel J.C., Noack-Fraissignes P., Sanguedolce V., Pizant J., Thirion X., Robaglia-Schlupp A., Pellissier J.F., Fontes M. Nature Genet. 10: 396-401 (2004)). 따라서 CMT1A 중복/HNPP 결실을 정확히 진단할 수 방법이 개발된다면, 정확한 조기진단이나 발병전 진단에 따라 궁극적으로는 발병억제 및 맞춤치료가 가능하게 될 것이다. 본 발명은 바로 17p11.2-p12의 중복 및 결실을 원인으로 하는 CMT1A와 HNPP의 정확한 진단에 관한 것이다.

<12> 유전성 신경질환에 대한 분자유전학적 연구는 주로 유럽을 중심으로 이루어져 왔으며, 2000년대 이후에는 미국이나 유럽에서 뿐만 아니라 일본에서도 유전성 신경질환에 대한 연구가 상당히 이루어지고 있다. 요시하라 등(Yoshihara T., Yamamoto M., Doyu M., Misu K.I., Hattori N., Hasegawa Y., Mokuno K., Mitsuma T., Sobue G. Hum. Mutat. 16: 177-178 (2000))과 누마쿠라 등(Numakura C., Lin C., Ikegami T., Guldberg P., Hayasaka K. Human Mutat.20: 392-398 (2002))은 일본인 100여명의 CMT 질환 환자를 대상으로 CMT1A 중복, PMP22, MPZ 및 Cx32에서의 원인 돌연변이를 검출하였다. 아직 한국인에 대한 CMT 질환의 발병 빈도에 대한 정확한 통계는 없지만 유럽인과 비슷할 것으로 추측되고 있다. 본 발명에서는 먼저 한국인 CMT 환자 및 가족을 대상으로 CMT 발병의 유전적 원인을 정확히 분석하고 외국 데이터와 비교하여 진단방법에 따른 정확한 확진율을 파악하고자 한다.

<13> 유전성 신경질환의 대부분을 차지하는 CMT는 크게 신경 수초의 탈수초화(demyelination)에 기인하는 CMT1과 축삭 돌기의 손상에 기인하는 CMT2로 나누어진다. CMT1중 50% 이상은 PMP22(peripheral myelin protein 22) 유전자가 위치하는 17p11.2-p12의 1.5Mb 중복으로 발병하는데, 이를 CMT1A 질환이라고 하며 전체 CMT 질환군 중에서 가장 높은 비율을 차지하고 있다. 또, HNPP 질환은 CMT1A 질환과는 반대로 염색체 17p11.2-p12 지역의 결실이 70-100%에서 있는 것으로 보고되어 있다. 따라서 PMP22 유전자의 중복이 있으면 CMT1A, 그리고 결손이 있으면 HNPP 질환으로 확진을 할 수 있다.

<14> CMT1A 중복과 HNPP 결실을 검사하기 위해서는 기존에는 방사선 동위원소를 이용하는 서던블롯팅(Southern blotting) 방법을 사용하였으나, 최근에는 1.5Mb 중복/결실 지역내에 존재하는 microsatellite의 타이핑 방법을 활용함으로써 위험한 방사성 동위원소를 사용하지 않아도 검사가 가능해졌다. 그러나 타이핑에 주로 사용되는 D17S921, D17S955, D17S839, D17S122 마커들은 (CA)_n 반복 서열로 PCR 수행 시 심한 slippage 현상에 의한 비특이적 DNA 증폭반응이 심하게 나타나므로 정확한 타이핑이 어려운 실정이다 (Mersiyanova I.V., Ismailov S.M., Polyakov A.V., Dadali E.L., Fedotov V.P., Nelis E., et al. Human Mutat. 15: 340-347 (2000)). 그러므로 진단의 정확성을 위해서 방사성 동위원소를 사용하거나 환자의 검사를 위해서 부모의 시료도 반드시 필요로 하게 되는 단점이 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<15> 본 발명은 신경 수초의 PMP22 유전자를 포함하는 염색체 17p11.2-p12의 중복이 원인으로 알려져 있는 CMT1A와 17p11.2-p12의 결실이 원인으로 알려져 있는 HNPP의 진단에 관한 것이다.

<16> 먼저 본 발명에서는 CMT 환자 가계의 시료 및 임상자료를 수집하여 환자집단에 대한 CMT1A 중복(duplication)과 HNPP 결실(deletion)을 조사하고 이를 토대로 CMT1A 중복과 HNPP 결실이 한국인의 전체 유전성 신경질환의 발병 진단에서 차지하는 비중과 이를 이용한 확진율을 파악한다.

<17> 본 발명의 궁극적인 목적은 염색체 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 정확히 검출하여 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 병인으로 하는 CMT1A와 HNPP를 정확히 진단하는 것이다.

<18> 이를 위해 본 발명에서는 17번 염색체 단암의 17p11.2-p12 1.5Mb 지역에 분포하는 microsatellite 마커들로서 기존에 사용되던 마커들을 포함하여 새로운 마커들을 탐색, 선정한다. 특히 종래에 활용되던 D17S839, D17S955 등의 마커들이 'CA' dinucleotide repeat를 보여 PCR 증폭시 심한 slippage 현상을 보임에 따라 본 발명에서는 이러한 문제점을 해소하고 정확한 진단을 하기 위해 17p11.2-p12에 존재하는 microsatellite 중 3-5bp 반복 서열을 보이면서 이형접합율이 높고, 대립유전자의 종류가 많은 새로운 마커들이 개발, 선정된다.

<19> 또한, 본 발명에서는 개발된 새로운 마커들을 동시증폭(Multiplex PCR)할 수 있는 조건을 확립하여 프라이머를 제작하고 진단키트를 구성한다.

<20> 선정된 마커들을 PCR로 증폭한 후 자동염기서열분석기(Automatic sequencer)를 이용하여 검체를 빠르게 분석하고 GENESCAN 및 GENOTYPER 프로그램 (Applied Biosystems)을 이용한 DNA타이핑을 실시하여 해당 영역의 중복 및 결실을 정확히 검출한다.

<21> 또한, 본 발명에서는 확보된 CMT 환자 가계 시료 및 임상자료를 이용하여 일반 정상인(100명 이상)과 환자가족군(50명 이상)에 대한 비교분석 실험 데이터를 확보하고, 각 마커에 대한 표준 allele ladder를 제작하여 해당 영역의 중복 및 결실에 대한 검진의 정확도가 99.9% 이상이 되도록 한다.

<22> 본 발명의 다른 목적 및 장점들은 하기에 설명될 것이며, 본 발명의 실시예 의해 더 잘 알게 될 것이다.

【발명의 구성】

<23> 본 발명에서는,

<24> 17번 염색체 17p11.2-p12 지역 내에 존재하는 microsatellite를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 해당 지역의 중복 및 결실을 판단하는 유전성 신경질환의 진단방법에 있어서,

<25> D17S921, D17S9B, D17S9A, D17S918, D17S122 및 D17S4A의 6좌위를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 중복 및 결실을 판단하는 것을 특징으로 하는 유전성 신경질환의 진단방법이 제공된다.

<26> 상기 6개의 마커를 사용하여 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단할 경우 정확도는 99.9% 이상이 된다. 상기 마커 중 일부, 예를 들어 D17S9B, D17S9A, D17S918의 3개의 마커만을 사용해도 정확도는 기존의 진단방법에 비해 매우 높은 97.5% 이상이 된다. 그러나, 오진율을 줄이기 위해서는 6개의 마커를 모두 사용하는 것이 바람직하며, 6개의 마커는 동시에 PCR 증폭하여 사용하거나, 경우에 따라서는 3개의 마커를 사용하여 진단한 후 확진이 어려울 경우에 나머지 마커를 사용하는 2단계 방식으로 순차적으로 사용한다.

<27> 또한, 본 발명에서는 상기 마커들에 대해 동시증폭(Multiplex PCR)의 조건을

확립한 서열번호 1 내지 12의 프라이머가 제공된다.

<28> 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머; 서열번호 7, 8의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머를 차등적인 농도로 섞은 혼합액과 표준 allele ladder를 사용하여 상기 6개의 마커를 동시에 증폭한 후 DNA타이핑하여 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단한다.

<29> 본 발명의 또 다른 실시예에서는,

<30> (a) 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머 및 서열번호 7, 8의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 사용하여 해당 3개의 마커를 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 1차로 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단하는 단계;

<31> (b) 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 사용하여 해당 3개의 마커를 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 2차로 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단하는 단계;를 포함하는 2단계 방식을 사용한다.

<32> 또한, 본 발명에서는,

<33> 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머; 서열번호 7, 8의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 17p11.2-

p12 지역의 중복 및 결실을 진단하는 유전성 신경질환의 진단키트가 제공된다.

<34> 본 발명에서 제공하는 진단키트의 또 다른 형태는,

<35> 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머 및 서열번호 7, 8의
프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 1차키트와,

<36> 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12
의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 2차키트로
이루어진다.

<37> 이하, 구체적인 실험 및 분석사례 등의 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세
히 설명한다. 그러나 다음의 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니
며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술
사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가
능한 것은 물론이다.

<38> **환자 시료 수집 및 DNA 추출**

<39> (1) CMT 환자 가계의 시료 및 임상자료 수집

<40> 본 발명에서는 한국인 CMT 질환 환자 본인과 그 가족들을 포함하는 90여 가
계의 시료를 수집, 분석하였다. 환자 및 그 가족의 시료는 병원에서 93년 이후 10
여 년 동안 수집된 것으로 환자의 임상적 특징과 가계의 병력을 확보한 것이며, 환

자별 임상적 특징과 유전자 변이와의 상관성을 조사한 것이다.

<41> (2) 시료채취 및 DNA 추출

<42> 유전성 신경질환 환자 가계의 구성원 및 정상인(대조군)으로부터 혈액이나 타액을 시료로 채취하였다. 혈액은 EDTA가 처리된 튜브에 모은 후, DNA 정제 장치를 사용하여 genome DNA를 추출하며, 모근이나 타액으로부터의 DNA 추출은 55℃에서 3hr의 프로테이나제 K(Proteinase K)를 처리한 후 페놀:클로로포름 방법으로 추출하였다.

<43> (3) CMT로 인한 기능저하 척도 (FDS: functional disability scale)의 분류

<44> 임상적 특징 등의 판단에 CMT 질환의 심한 정도를 측정하기 위하여 9단계로 된 기능저하 척도를 사용하였으며, 기준은 다음과 같다 (Birouk et al., 1998).
0: 정상, 1: 정상이지만 피로감이나 통증이 있는 경우(normal but with cramps and fatigability), 2: 달리기를 할 수 없는 경우(inability to run), 3: 걷기가 어렵지만 도움 없이 걷는 것이 가능한 경우, 4: 지팡이를 가지고 걸을 수 있는 경우(walk with cane), 5: 목발을 가지고 걸을 수 있는 경우(walk with crutches), 6: 보조기를 착용하고 걸을 수 있는 경우(walk with a walker), 7: 휠체어를 타고 다녀야 하는 경우(wheelchair bound), 8: 누워서 생활하는 경우(bedridden).

<45> 마커의 선정

<46> 17p11.2-p12의 중복 및 결실을 정확히 검출하기 위해 17번 염색체 단암의

17p11.2-p12 1.5Mb 지역에 분포하는 microsatellite 마커들로서 지금까지의 연구에서 사용되던 마커들을 포함하여 새로운 마커들을 탐색하였다. 종래에 활용되던 D17S839, D17S955 등의 마커들은 'CA' dinucleotide repeat을 보여 PCR 증폭시 심한 slippage 현상을 보이므로 본 발명에서는 가능한 tri 내지 penta nucleotide 마커를 선별하였다.

<47> 도 1은 17번 염색체 17p11.2-p12의 1.5Mb 범위에 분포하는 microsatellite의 특성을 보여주고 있다. 본 발명에서는 17p11.2-p12에 존재하는 microsatellite 중 이형접합율이 높고($H \geq 0.7$), 대립유전자의 종류가 많은 것으로 선정하였으며, 최종적으로 D17S921: (CA)_n, D17S9B: (TTTC)_n, D17S9A: (CAATA)_n, D17S918: (CAG)_n, D17S122: (CA)_n, D17S4A: (ACCT)_n의 6좌위 microsatellite를 마커로 선정하였다 (표 2).

<48> 프라이머의 제작 및 키트의 구성

<49> (1) 동시증폭(Multiplex PCR)을 위한 조건 확립

<50> Microsatellite 마커들의 PCR 증폭을 위해 형광-표지된 프라이머를 제작하였다. 선정된 마커에 대해 T_m 값이 60-65℃로 비슷한 범위가 되게 프라이머를 디자인하고, 마커간에 PCR 산물의 크기가 중복되는 경우에는 서로 다른 2종류의 형광을 표지시켰다 (FAM, HEX). 다음의 표 2는 선정된 각 마커에 대한 프라이머 서열을 나타낸 것이다.

【표 2】

유전 마커	반복단위	형광표지	길이	Primer 서열
D17S921	(CA) _n	FAM	133-149	F: GTGTTGTATTAGGCAGAGTTCTCC (서열번호 1) R: GGCAGTAGATGGTGACTTTATGGC (서열번호 2)
D17S9B	(TTTC) _n	HEX	95-135	F: TCTCAGTCCTGATTCTTGATTTTG (서열번호 3) R: CCAGAGCTAACACCACATTCA (서열번호 4)
D17S9A	(CAATA) _n	HEX	154-204	F: CAACCATCAGTGATTGATGGTTTAC (서열번호 5) R: GAGTTGTCCTAGAACCCCTGTC (서열번호 6)
D17S918	(CAG) _n	HEX	235-250	F: TCCTGTAATCTGTCCCAAACGTC (서열번호 7) R: TTCCTCACACAACCTATTGATAGTC (서열번호 8)
D17S122	(CA) _n	FAM	206-228	F: AGAGCTGTTCTGCTGAAGTCACTC (서열번호 9) R: GGCAGGCCAGACAGACCAGGCTC (서열번호 10)
D17S4A	(ACCT) _n	FAM	160-180	F: CTGTGGAGGAAAAGAAACACTGCC (서열번호 11) R: GCACTAAAGTAGCTTGAACTCTG (서열번호 12)

<52> (2) PCR 키트의 구성

<53> 표 2의 6 마커를 동시에 증폭하는 Hexplex PCR kit 또는 각각 3 마커를 동시에 증폭하는 triplex PCR kit의 형태로 구성된다. 또, 정상인(=100)과 환자가족군(=50)에 대한 비교분석 실험 데이터와 각 마커에 대한 표준 allele ladder를 제작하여 검진의 정확도가 99.9% 이상이 되도록 하였다. 제조에는 다음과 같다.

<54> 제조예 1 : D17S921, D17S9B, D17S9A, D17S918, D17S122, D17S4A의 6좌위 마커를 모두 동시에 증폭시키기 위해 서열번호 1 내지 12로 표시된 6쌍의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체를 포함하는 Hexplex PCR kit로 구성된다.

<55> 제조예 2 : 각각 triplex PCR kit인 Kit A와 Kit B를 포함하여 구성된다.

키트 A는 D17S9A, D17S9B, D17S918의 3좌위 마커를 증폭시키기 위해 HEX로 표시시킨 서열번호 3내지 8의 3쌍의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체를 포함하며, 키트 B는 D17S921, D17S122, D17S4A의 3좌위 마커를 증폭시키기 위해 FAM으로 표시시킨 서열번호 1,2 및 9 내지 12의 3쌍의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체를 포함한다. Kit A 및 Kit B를 구성하는 각각의 3 마커들은 모두 동일한 형광물질로 표시시켰기 때문에 유전형 분석시 단일 크로마토그램에서 유전자형의 확인이 이루어진다.

<56> **진단키트를 이용한 유전자형 분석 및 진단**

<57> 본 발명의 진단키트를 이용하여 PCR을 수행한 후 자동염기서열분석기를 이용하여 검체당 single-lane 만을 이용한 분리 시스템을 적용하고 GENESCAN 및 GENOTYPER 프로그램을 이용하여 DNA타이핑을 실시하였다.

<58> **(1) CMT1A 및 HNPP 유전병의 DNA 진단 키트를 환자 가계에 적용한 사례**

<59> 본 발명의 키트를 이용하여 실제 유전성 신경질환 환자 3가족(FC87, FC91, HN42)에 대해 유전자검사를 실시하였다.

<60> ① 분석된 환자 가계의 임상적 분석

<61> FC87 : '모'와 '자(아들)'가 CMT1 환자이며, '부'는 정상임.

<62> FC91 : '모', '자1(아들)' 및 '자2(딸)'가 CMT1 환자이며, '부'는 정상임.

<63> HN42 : '부'와 '자'가 HNPP 환자이며, '모'는 정상임.

<64>

② 진단키트

<65>

상기 제조예 1에서 만든 서열번호 1 내지 12의 6쌍의 프라이머 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 Hexplex PCR kit를 사용하였다.

<66>

③ PCR 증폭 조건

<67>

96℃(3min)

<68>

94℃(1min)-60℃(1min)-70℃(1min) : 32 cycles

<69>

60℃(50min)

<70>

④ 분석

<71>

PCR 증폭물은 자동염기서열분석기(ABI 3100)로 분석하고 유전자형은 GENESCAN과 GENOTYPER 프로그램을 이용해 분석하였다 (Applied Biosystems).

<72>

⑤ 결과

<73>

결과를 도 2, 도 3, 및 표 3에 나타내었다.

<74>

도 2는 본 발명의 진단키트를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 자동염기서열분석기를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 2a는 CMT1 환자 가족(FC 87)으로 17p11.2-p12의 중복 및 결실이 없는 것으로 나타났으며, 도 2b는 CMT1 환자 가족(FC91)으로서 해당 염색체 지역이 '중복'된 것으로 나타났으며, 도 2c는 HNPP 환자 가족(HN42)으로서 해당 염색체 지역이 '결실'된 것으로 나타났다.

<75>

다음의 표 3은 도 2의 결과로부터 얻은 microsatellite 유전자형 데이터를 정리한 것이다.

【표 3】

가족 번호	가족 사항	성별	환자 여부	Microsatellite 마커						비고
				D17S921	D17S9B	D17S9B	D17S918	D17S122	D17S4A	
FC87 (CMT1 환자)	부	남	정상	6, 7	11, 11	11, 14	8, 8	3, 11	16, 19	
	모	여	환자	3, 7	12, 15	13, 13	8, 12	3, 11	14.2, 18	
	자	남	환자	7, 7	11, 12	13, 14	8, 8	3, 3	18, 19	
FC91 (CMT1 환자)	부	남	정상	3, 6	13, 14	13, 13	12, 12	12, 14	14.2, 15.2	
	모	여	환자	6-7, 7	12-12, 15	13-15, 12	8-12, 8	3-13, 12	14.2-18, 17	중복
	자1	남	환자	6-7, 3	12-12, 13	13-15, 13	8-12, 12	3-13, 12	14.2-18, 15.2	중복
	자2	여	환자	6-7, 3	12-12, 13	13-15, 13	8-12, 12	3-13, 12	14.2-18, 15.2	중복
HN42 (HNPP 환자)	부	남	환자	4, (-)	9, (-)	14, (-)	12, (-)	12, (-)	16, (-)	결실
	모	여	정상	3, 7	11, 11	11, 13	8, 12	11, 12	14.2, 16	
	자	남	환자	7, (-)	11, (-)	13, (-)	8, (-)	12, (-)	16, (-)	결실

<77> 상기 분석결과를 토대로 도 3에 3가족의 가계도를 나타내었다.(□,○: 정상
인; ■,●: 환자)

<78> 분석결과를 각 가계별로 정리하면 다음과 같다.

<79> (a) FC87 가계

<80> 본 발명의 키트를 적용한 결과, 이 환자 가족은 17p11.2-p12 부위의 중복이
나 결실이 관찰되지 않았다. 따라서 이 가족은 17p11.2-p12의 중복/결실이 아닌
다른 유전자 돌연변이가 원인인 것으로 판단되었다.

<81> (b) FC91 가계

<82> 본 발명의 키트를 적용한 유전자 검사 결과, '모', '자1', 및 '자2'에서

17p11.2-p12의 중복이 관찰되었다. 따라서 '모', '자1', 및 '자2'를 CMT1A 환자로 진단하였다. 또한, 분석 결과는 환자인 '모'로부터 2명의 자식(환자)에게 유전되는 '염색체 중복성과 환자 관계가 명확하게 일치하는 것으로 나타났다. 도 3에서 음영 처리된 부분이 중복된 염색체 부위로서 모, 자1, 자2에서 볼 수 있다.

<83> (c) HN42 가계

<84> 본 발명의 키트를 적용한 유전자 검사 결과, 부와 자에서 17p11.2-p12의 결실이 관찰되었으며, 모에서는 중복이나 결실이 관찰되지 않았다. 즉, 부의 결실이 자식에게 유전되면서 HNPP 환자가 되었음을 확인할 수 있었다.

<85> (2) 한국인 환자집단에 대한 CMT1A 중복(duplication)과 HNPP 결실(deletion) 조사

<86> 한국인 CMT1 환자 28 가족을 대상으로 6 microsatellite 마커의 genotyping으로 염색체 17번의 17p11.2-p12의 중복을 조사하였다. 조사결과 15 가족에서 중복이 관찰되어 53.6%로 나타났다. 본 발명에서 조사된 중복율은 이탈리아 57.6% (Mostacciuolo et al. Human Mutat. 18: 32-41 (2001), 러시아 53.7% (Mersiyanova et al. Human Mut. 15: 340-347 (2000))와 유사한 결과이다. 또, HNPP는 전체 24 가족 중 19 가족에서 결실이 관찰되어 79%로 나타났다.

【발명의 효과】

<87> 본 발명에 따르면, 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 검출하는 진단의 정확도가 99.9% 이상이 되며, 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 병인으로 하는 유전성 신경질환의 비율을 고려할 때 본 발명의 진단키트로 1차 진단할 때 전체 CMT 환자의 50% 이상과 HNPP 환자의 70% 이상에 대해 정확한 유전적 원인의 확인이 가능하다. 또, 본 발명자의 다른 발명인 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 제외한 다른 유전자 돌연변이를 병인으로 하는 유전성 신경질환의 진단키트를 본 발명의 진단키트와 함께 적용할 경우에는 전체적인 유전적 원인의 검출 비율이 90% 이상이 된다. 또한 기존의 써던 블로팅 방법을 배제함으로써 방사선 동위원소를 사용하지 않아도 되는 장점을 가지고 있다.

<88> 따라서, 본 발명에 따르면 유전성이 강하면서도 단일 유전자 결함에 의해 발병하는 유전성 신경질환에 대하여 유전자 검사를 통한 정확한 조기 진단을 가능케 하며, 정확한 진단에 따라 최근 개발되고 있는 치료방법을 조기에 적용하여 치료할 수 있고, 나아가 정확한 병인에 따른 맞춤치료까지 가능케지게 된다. 또 본 발명은, 아직 세계적으로도 유전성 신경질환의 유전자 진단시스템의 개발이 이루어지지 않은 상태에서 한국인의 유전성 신경질환의 유전적 원인을 먼저 분석하고 그 자료를 바탕으로 유전자 진단 키트를 개발함으로써 우리 국민에게 인종적 특성을 감안한 양질의 의료 서비스가 제공되는 토대가 될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

17번 염색체 17p11.2-p12 지역 내에 존재하는 microsatellite를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 해당 지역의 중복 및 결실을 판단하는 유전성 신경질환의 진단방법에 있어서,

D17S921, D17S9B, D17S9A, D17S918, D17S122 및 D17S4A의 6좌위를 마커로 하여 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 중복 및 결실을 판단하는 것을 특징으로 하는 유전성 신경질환의 진단방법.

【청구항 2】

청구항 1에 있어서,

상기 PCR은 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머; 서열번호 7, 8의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 사용하여 상기 6개의 마커를 동시에 증폭하는 것임을 특징으로 하는 진단방법.

【청구항 3】

청구항 1에 있어서,

(a) 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머 및 서열번호 7, 8의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 사용하여 해당 3개의 마커를 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 1차로 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판

단하는 단계;

(b) 서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 사용하여 해당 3개의 마커를 PCR 증폭한 후 DNA타이핑하여 2차로 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단하는 단계를 포함하는 진단방법.

【청구항 4】

서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머; 서열번호 7, 8의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 진단하는 유전성 신경질환의 진단키트.

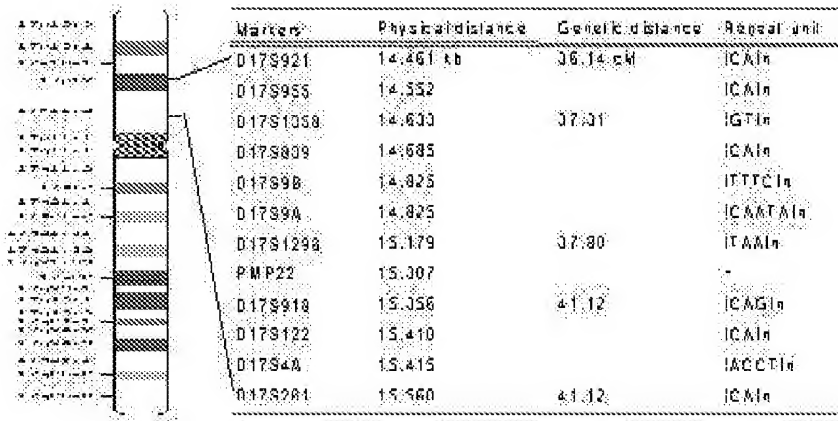
【청구항 5】

서열번호 3, 4의 프라이머; 서열번호 5, 6의 프라이머 및 서열번호 7, 8의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 1차키트와,

서열번호 1, 2의 프라이머; 서열번호 9, 10의 프라이머 및 서열번호 11, 12의 프라이머의 차등적 농도의 혼합체와 표준 allele ladder를 포함하는 2차키트로 이루어진 17p11.2-p12 지역의 중복 및 결실을 판단하는 유전성 신경질환의 진단키트.

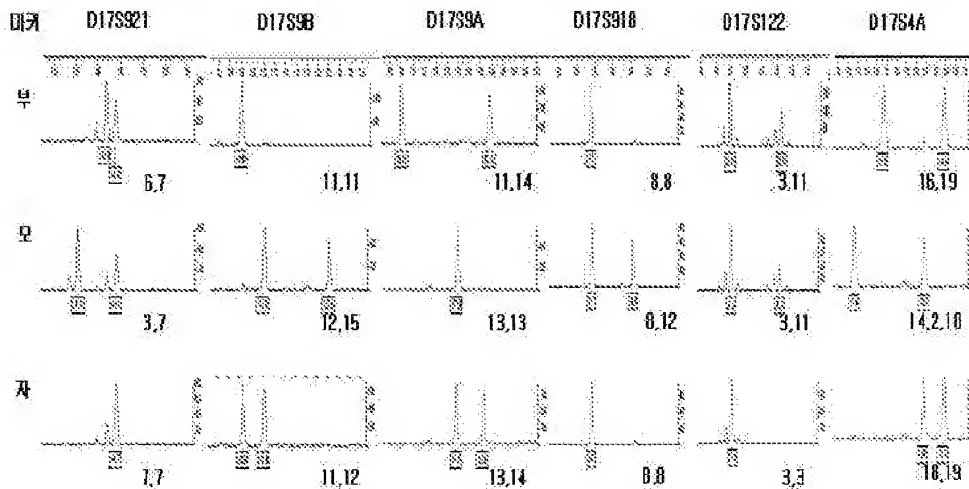
【도면】

【도 1】



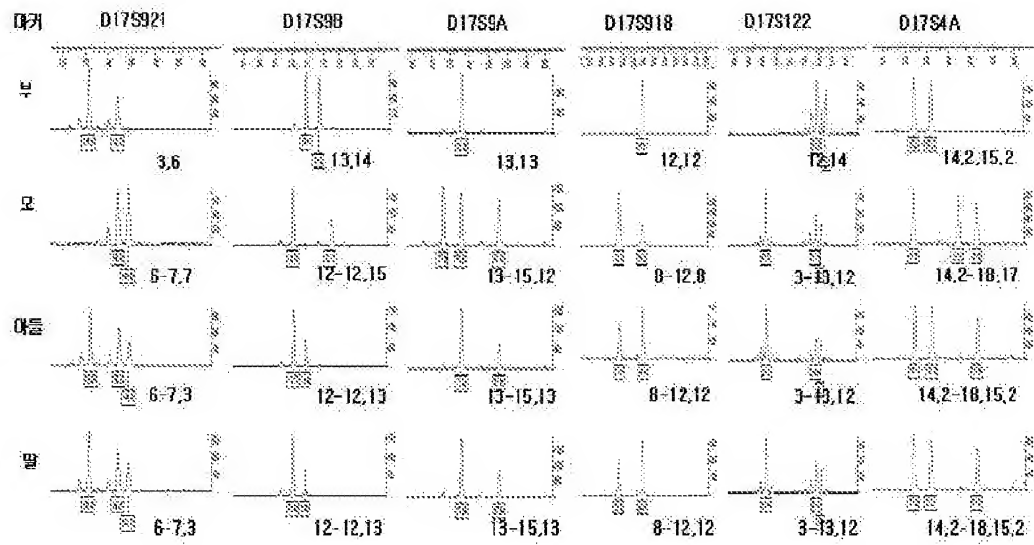
【도 2a】

(a) EC87: CMT1 환자 가족



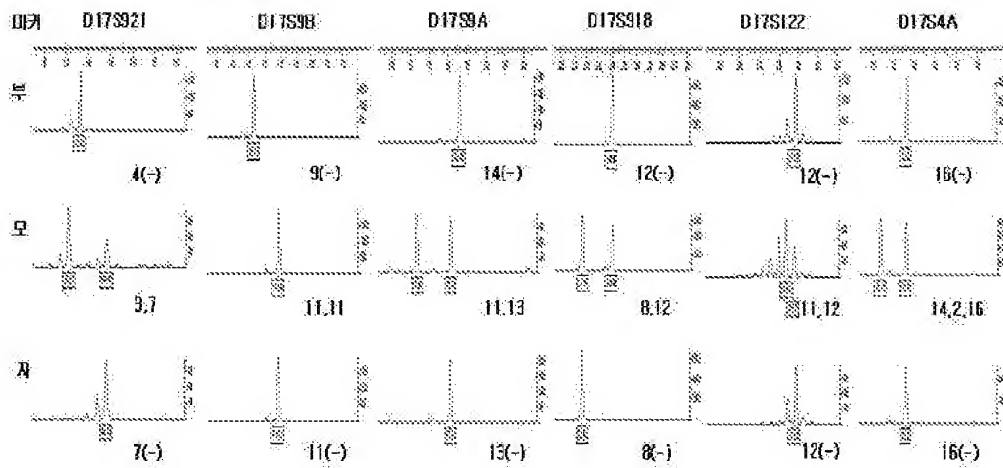
【도 2b】

(b) FC91: CMT1 환자 가족



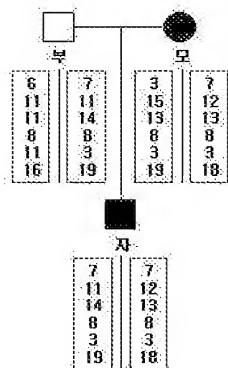
【도 2c】

(c) HN42: HNPP 환자 가족

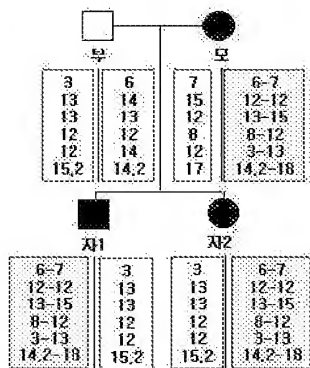


【도 3】

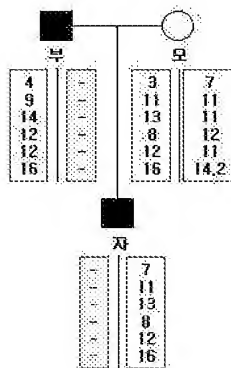
(a) FC87 CMT1 환자 가계



(b) FC91 CMT1 환자 가계



(c) HN42 HNPP 환자 가계



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

<110> CHUNG, Ki Wha
CHOI, Byung Ok

<120> Diagnosis method and kits for inherited neuropathies caused by
duplication or deletion of chromosome 17p11.2-p12 region

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(F)

<400> 1

gtgttgtatt aggagagatt ctcc

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(R)

<400> 2

ggcagtagat ggtgacttta tggc

24

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer(F)

<400> 3
tctcagtcct gatttcttga ttttg 25

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer(R)

<400> 4
ccagagctaa caccacattc a 21

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer(F)

<400> 5

caaccatcag tgattgatg gtttac

26

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(R)

<400> 6

gagttgtcac tagaaccctg ttc

23

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(F)

<400> 7

tcctgtaatc tgtccccaaa cgtc

24

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(R)

<400> 8
ttcctcacac aacctattga tagtc 25

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer(F)

<400> 9
agagctgttc tgctgaagtc actc 24

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer(R)

<400> 10
ggcaggccag acagaccagg ctc 23

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(F)

<400> 11

ctgtggagga aagaaaacac tgcc

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer(R)

<400> 12

gcactaaagt agcttgtaac tctg

24